

# 成果報告書（別紙）

## 研究の概要

おおくのタンパク質は合成されるさいに糖鎖修飾される。タンパク質に糖鎖を付加する酵素が数多く知られている。これらの糖鎖付加酵素が基質のタンパク質を認識することで、そのタンパク質の糖鎖修飾が決定されている。ただし糖鎖修飾がされないことで、さまざまな病気になることが明らかとなった。しかしながら、糖鎖付加酵素がどのように基質となるタンパク質を認識しているのかわかっていない。この問いに答えるために、糖鎖付加酵素の構造学的解析をおこない、原子レベルでのその基質を認識する仕組みを解明する。

## 研究の背景

ホルモンや血清のタンパク質など、細胞外に分泌される細胞外タンパク質や、受容体やチャネルなどの膜タンパク質のほとんどすべてが糖鎖修飾されている。糖鎖修飾されるタンパク質の部位、つまりアミノ酸残基は定められており、アスパラギン側鎖（N型糖鎖）か、セリン・スレオニン側鎖（O型糖鎖）に結合されている。これらのアミノ酸に糖鎖をつなげる酵素が知られており、またグルコースやガラクトースなど、つなげられる糖の種類によって酵素が分類されている (<http://www.cazy.org/>) (Lombard et al.)。

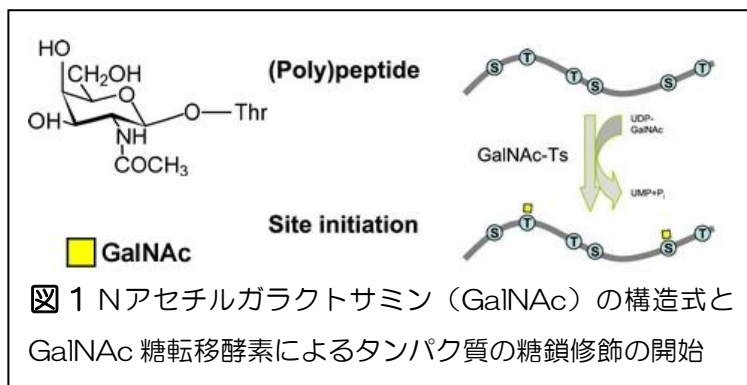
とくにセリン・スレオニン側鎖にNアセチルガラクトサミン (図1左) をつなげる酵素 (Nアセチルガラクトサミン転移酵素群) は、多くのO型糖鎖修飾の律速段階をになっている (Bennett et al.,

Yoshimura et al.)。この酵素がはたらかないとO型糖鎖が全く作られなくなるため、タンパク質の糖鎖修飾への影響が大きくなる。そのため、Nアセチルガラクトサミン転移酵素群の遺伝病がもっとも多く知られている (Varki et al.)。これまでにO型糖鎖修飾に必要な、Nアセチルガラクトサミン転移酵素群の遺

伝的疾患には、脂質代謝異常やミネラル代謝異常を示すものが見つかった (Kato et al., Kitada et al., Tagliabracci et al., Topaz et al.)。

それではどのようにしてこれらの糖転移酵素群は、基質である特定のタンパク質を認識し、決まったアミノ酸残基に糖を付加できるのだろうか。この答えをえるために、コペンハーゲン糖鎖解析センターでは、大規模なO型糖鎖修飾の解析がおこなわれてきている (Yang et al.)。つまり、O型糖鎖が修飾されているセリン・スレオニン側鎖の前後のアミノ酸配列に、特徴的なコンセンサス配列がえられるのであれば、その配列を糖転移酵素が認識していることが分かるからである。しかしながら、数年にわたる解析と大規模データの蓄積によって、明確なコンセンサス配列は存在しないことが次第に明らかとなった。

タンパク質がどのように基質を認識しているかを知るには、そのタンパク質が基質と結合している様子を原子レベルで見る必要がある。たとえば、結晶構造解析の手法では数オングストロームの分解能で分子を観察できる。そのために、糖転移酵素群と基質が結合した共結晶を作り、X線回折をもちいたX線結晶構造解析をおこなうことにした。



## 実験方法と材料

糖転移酵素群の発現株の樹立、タンパク質の産生とその精製

ベクター（pCDNA3）にC末にヒスタグを付けたヒト糖転移酵素Aとヒト糖転移酵素Bをサブクローニングして、ほ乳動物に発現させられる発現ベクターを作製した。これらの糖転移酵素のN末にある細胞膜貫通ドメインを遺伝子工学的に除き、分泌シグナルを付けることで細胞外に分泌される組み替え体の糖転移酵素遺伝子をもちいた。チャイニーズハムスターオバリー細胞（CHO）に、直鎖化したベクターを遺伝子導入し、培養液中に選択マーカを加えることでコロニーを選択し、タンパク質を高発現する細胞株を樹立した。

樹立した高発現（CHO）株を3リットル培養液規模で増殖させ、コンフルエント（細胞の付着領域が培養容器面の90-100%をしめること）に達したのち48時間新しい培養液で培養した。およそ3リットルの培養液を限外ろ過カラムで濃縮して、50ミリリットル以下にしたものに1/10量の10×リン酸緩衝液（PBS, pH7.4）を加えた、フィルター清浄（0.22 マイクロメートル）したサンプルから精製した。

精製にはヒスタグに対するアフィニティーカラム（HisTrap HP columns）を、中圧クロマトグラフィー（AKTA purifier）につなげて使用した。ランニング緩衝液としてリン酸緩衝液（20 mM Phosphate buffer, pH7.4, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole）、溶出緩衝液として500ミリモル濃度のイミダゾールを含むリン酸緩衝液（20 mM Phosphate buffer, pH7.4, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole）をもちい、イミダゾール濃度を40mM、60mM、100mM、300mMと段階的に上げる、step-by-step法でヒスタグタンパク質の溶出をおこなった。目的のタンパク質は100mMイミダゾール濃度の画分に溶出されてきたので、その画分を限外ろ過カラムで5 mlに濃縮し、セファクリルゲルろ過カラムで最終精製するとともにグッドバッファー（20mM HEPES, pH7.4）にバッファーを置換した。精製タンパク質サンプルを微量吸光度計で、280ナノメートルの紫外線吸光度を測ることによってそのタンパク質濃度を定量した。

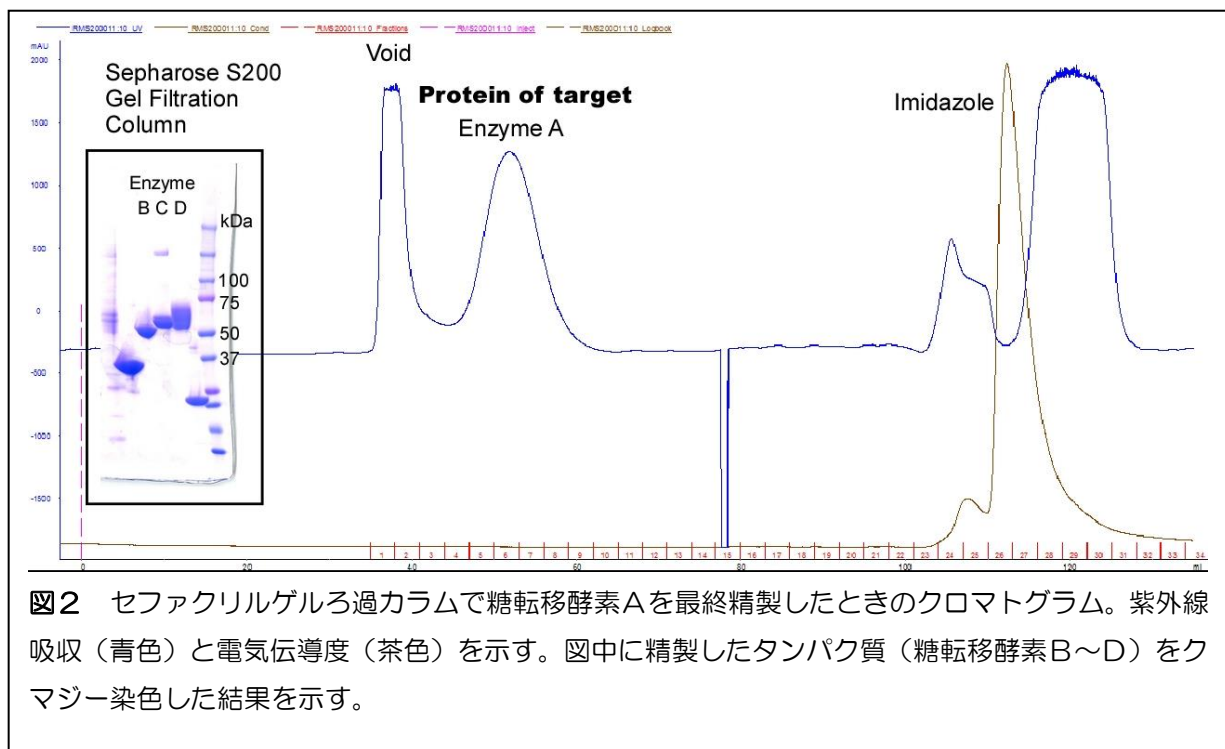


図2 セファクリルゲルろ過カラムで糖転移酵素Aを最終精製したときのクロマトグラム。紫外線吸収（青色）と電気伝導度（茶色）を示す。図中に精製したタンパク質（糖転移酵素B～D）をクマジー染色した結果を示す。

## 酵素活性測定実験

精製してえられた糖転移酵素Aと糖転移酵素Bの酵素活性を、以下のように測定した。各1  $\mu\text{g}$  の酵素を活性化ガラクトサミン (UDP-GalNAc) とともに基質ペプチドと反応させた。反応を37°Cですすめ、30分、1時間、3時間、12時間後にそれぞれサンプルを回収した。そのときの基質ペプチドに付加されたガラクトサミン糖鎖を、質量分析計 (MALDI TOF-MASS) により検出した (図3)。

## 結晶化条件スクリーニング

タンパク質濃度は8、12、24ミリグラム/ミリリットルの3段階で、結晶化溶液は840種類を試した。結晶成育温度を4°C、25°C、37°Cで結晶化条件を求めた。タンパク質溶液の量を100ナノリットルとし、結晶溶液の量を100ナノリットルに加え、リザーバー溶液の量を50  $\mu\text{リットル}$ とした。およそ14日間後に結晶の有無を実体顕微鏡で観察した。糖転移酵素Aでは3条件で、糖転移酵素Bでは1条件で結晶化が認められた (結晶化条件は非記載)。

さらに、この条件を元に結晶の最適化を行った。タンパク質溶液の量を275ナノリットル、結晶化した条件の結晶化溶液の量を275ナノリットルとし、さらに50ナノリットルの添加物溶液 (288条件) を加えた。結晶化の見られた成育温度で14日間静置したのち、結晶の有無を観察した。その結果1種類の添加剤 (未公表) の効果により、糖転移酵素Aにおいて結晶の更なる成育が認められた。

## X線回折実験

十分な大きさの結晶をループですくいと、クライオ溶液に浸したのち、液体窒素で瞬間凍結した。凍結した結晶を放射光施設 (スペイン国アルバ放射光施設、英国ダイヤモンド放射光施設、スイスSLS放射光施設) にて、X線を照射し回折データを取得した。いずれも振動角は0.5°C、180度分の回折データを蓄積した。えられた回折データはXDSプログラムによって積分し、AIMLESSプログラムでスケールリングして解析したときの統計データをしめす。その結果2.9オングストローム解像度で、十分な解析が可能であることが示された。

## X線結晶構造解析

統合した回折データから、PHENIXプログラムで分子置換法により位相の解を求められた。REFMAC5プログラムで最適解を求め、糖転移酵素Aの2.9オングストローム解像度以下での結晶構造がえられた。三次元構造はCOOTプログラムで描写した。

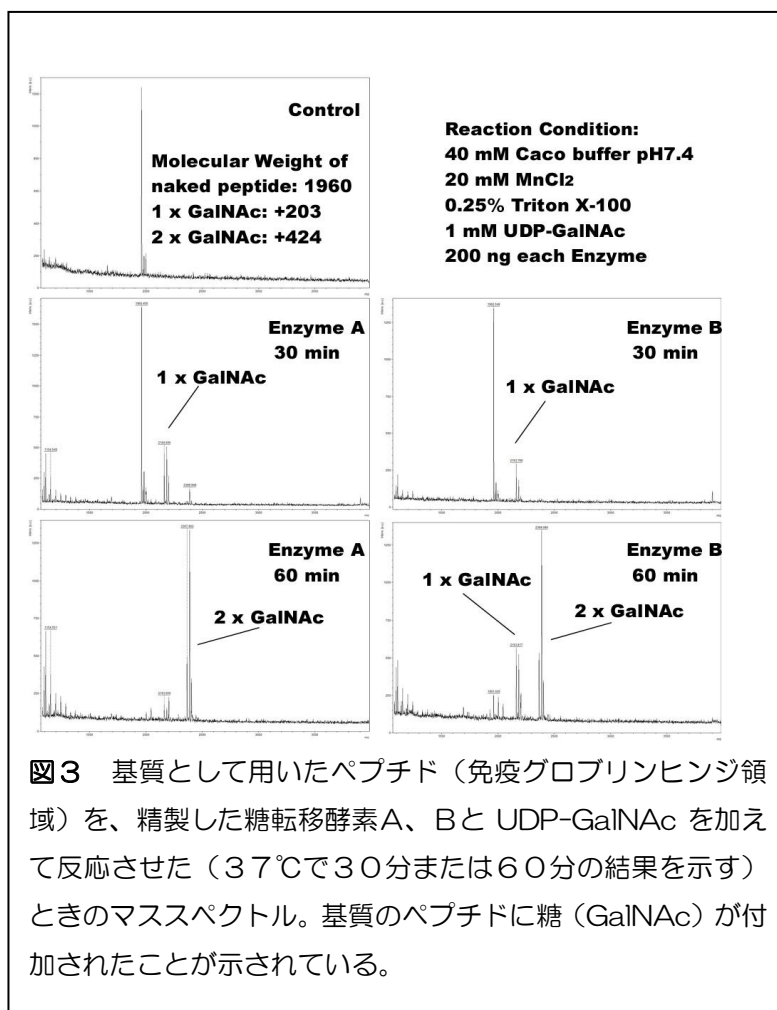


図3 基質として用いたペプチド (免疫グロブリンヒンジ領域) を、精製した糖転移酵素A、BとUDP-GalNAcを加えて反応させた (37°Cで30分または60分の結果を示す) ときのマスマスペクトル。基質のペプチドに糖 (GalNAc) が付加されたことが示されている。

## 研究の結果

結晶化する糖転移酵素群はすべて、ほ乳動物細胞に産生させたものを用いた。高発現株を作製することで、1リットル培養液から2ミリグラム程度の精製タンパク質をえることができた(図2)。酵素活性をペプチド(イムノグロブリンのヒンジ領域)と活性化ガラクトサミン(UDP-GalNAc)を基質とした、糖転移活性法で測定した。添加する酵素量を10, 30, 100, 300, 1000ナノグラムと増やしていき、37度で30分、60分反応させた。反応後のペプチドに付加されたガラクトサミンの数を、質量分析計によって測定した。その結果、天然型と同等の酵素活性と、基質特異性を示すことが確認できた(図3)。

この精製タンパク質をもちいて、結晶化条件のスクリーニングをおこなった。初期スクリーニングとして840種類の結晶化溶液を試した。タンパク質濃度を3種類試し、結晶成育温度は4度(冷蔵庫)、25度(室温)、および37度(体内温度)の3段階でおこなった。2週間以上にわたり結晶化プレート静置したのち、これらのプレート中で結晶が成育しているかどうかを、紫外線照射機能付きの実体顕微鏡で観察した。紫外線を照射することで、その結晶が紫外線を吸収しない塩などではなく、タンパク質であることを紫外線の吸収で確認することができる。これらの結晶化解析から、それぞれの糖転移酵素が結晶化することがわかり、それらの条件を求めることができた(図4)(結晶化条件は非公表)。それぞれの結晶の形には特徴があり、糖転移酵素Aは四角柱型の結晶が、ひとつの生育点から放射状に伸びて生育していた。このことは、結晶の「種」ができると、そこから全方位にむかってタンパク質が結晶を作れることを示唆する。

いっぽうで、糖転移酵素Bは細かい針の結晶を形づくった。このことは結晶化条件のさらなる最適化が必要になるが、すくなくとも糖転移酵素Bも結晶化しうることを示している。これらの結晶の形から、結晶構造解析には糖転移酵素Aの結晶の方がより向いていると考えられた。

そこでこれらの糖転移酵素について、これらの初期結晶化条件のもとづくことで、結晶構造解析でより小さな解像度を出せるような、より大きな結晶を得るべく、さらなる結晶化条件の最適化をおこなった(初期結晶化条件および最適化条件はいずれも非公表)。

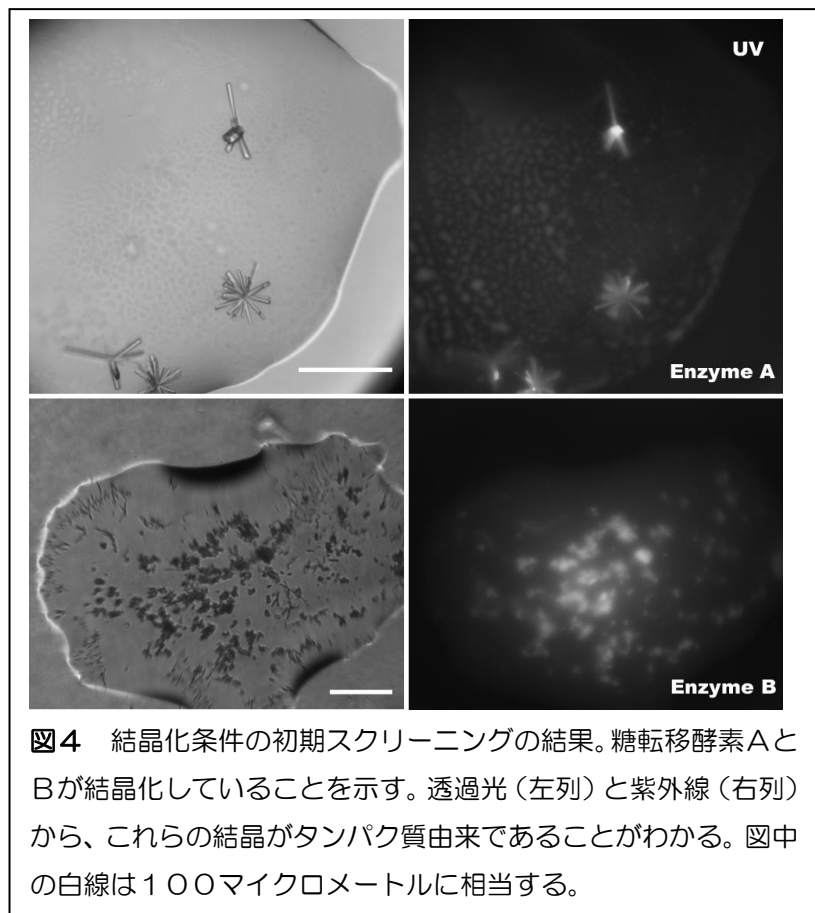


図4 結晶化条件の初期スクリーニングの結果。糖転移酵素AとBが結晶化していることを示す。透過光(左列)と紫外線(右列)から、これらの結晶がタンパク質由来であることがわかる。図中の白線は100マイクロメートルに相当する。



さらに、糖転移酵素Aの結晶は、その後の結晶化条件を最適化することでさらに大きく成長し、十分にX線結晶構造解析に用いられるほどであった（図5）。これらの結晶を溶解し、SDS-PAGE後にCBB染色でタンパク質を検出した（図6左）。このタンパク質はC末側にあるヒスタグの抗体で検出された（図6右）。この結果から伺えることは、糖転移酵素Aが結晶化するさいに、N末側のループの部分がタンパク質分解を受けていたことである。この結晶化した糖転移酵素AのN末端を知るために、エドマン分解によるN末端解析をおこなった。その結果、58番目のアミノ酸からN末端が始まっており、57番目と58番目のペプチド結合が切断を受けたことが分かった（図7）。

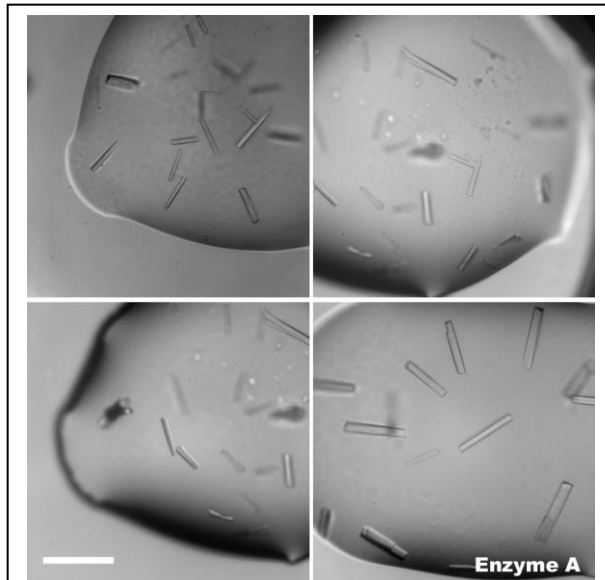


図5 結晶化条件の最適化スクリーニングによる結果（4条件）。いずれも糖転移酵素Aの結晶が大きく成長していることがわかる。これらの条件では、放射状ではなく一本の柱状に生育させることができた。図中の白線は100マイクロメートルに相当する。

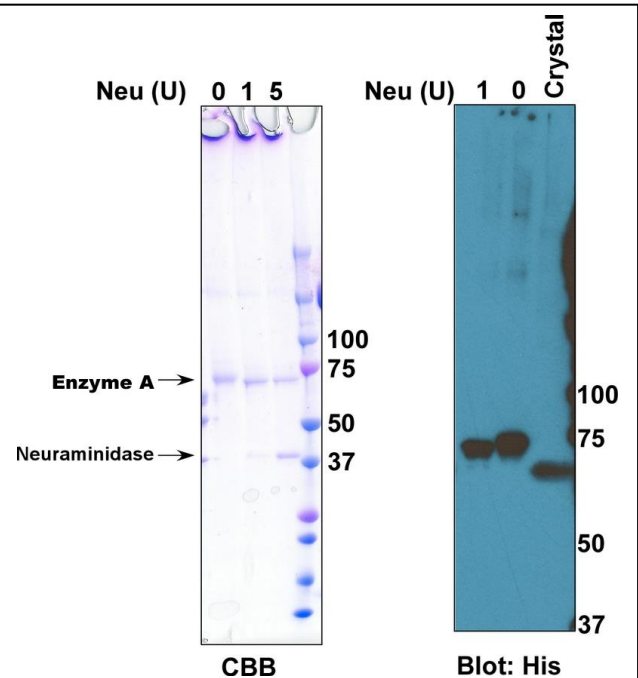


図6 糖転移酵素Aの結晶をSDS電気泳動してクマジー染色した結果（左列）。シアリダーゼ（Neuraminidase）処理により脱シアリ酸されていることが分かる。右列はヒス抗体でのウェスタンブロット。

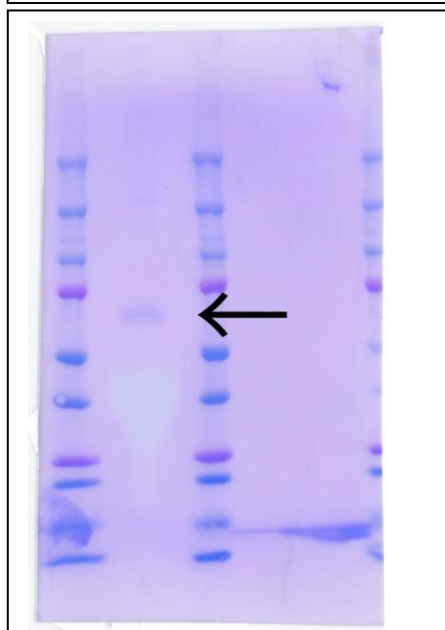


図7 エドマン分解にもちいた結晶中の糖転移酵素A（矢印）。



挿絵図 コペンハーゲン大学の研究室の方々

いっぽうで糖転移酵素Bにおいても同様に、ほ乳動物細胞から精製タンパク質をえることができた (図2)。この酵素の活性を問う転移活性法で測定し、天然の酵素と同等の活性を持つことを確認した (図3)。糖転移酵素Bの結晶化条件を糖転移酵素Aと同じ条件で初期スクリーニングすることで結晶化に成功した (図4)。さらなる結晶の最適化実験に進むことができた (図8)。この糖転移酵素Bの結晶構造解析は、現在進行中でもあり、ここより以降は糖転移酵素Aについての結晶構造解析について記す。

糖転移酵素Aの結晶にX線を照射してデータを集めるために、まず結晶の不凍化条件を求めた。グリセロール濃度を滴定して、インハウスのX線源で照射することで、回折像を評価して効果のあるグリセロール濃度を求めることができた (図9)。もとめた条件の不凍液 (12.5%グリセロールを含む結晶化溶液) で、結晶を液体窒素にひたし、瞬間的に凍結した。この凍結した結晶のあらゆる角度から、放射光施設にてX線を照射することで、そのX線回折データ (360枚のX線回折像) を取得した (図10)。回折実験はサラゴサ大学のグレロ教授と共同でおこない、おもに英国のダイヤモンド放射光施設、スペインのアルバ放射光施設、スイスのSLS放射光施設でおこなった。測定条件を表に示す (表1)。X線回折像のデータ解析から、およそ2.9オングストローム解像度で、糖転移酵素Aの結晶構造データの取得に成功した。

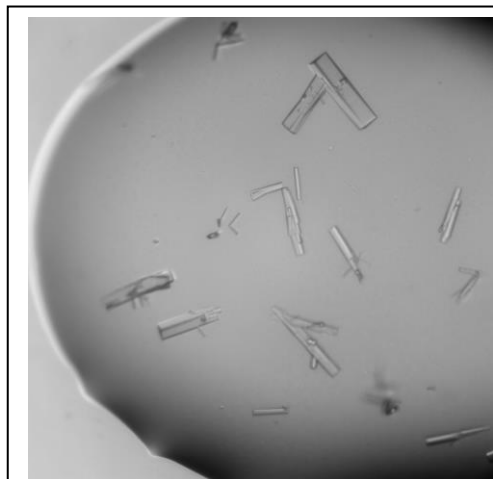


図8 結晶化条件を最適化した糖転移酵素Bの結晶。

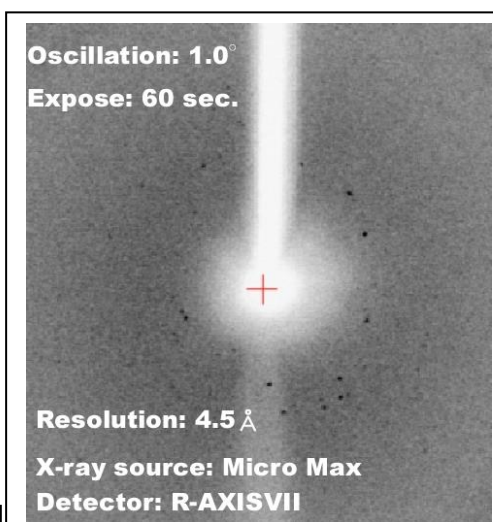


図9 クライオ条件でのX線回折像

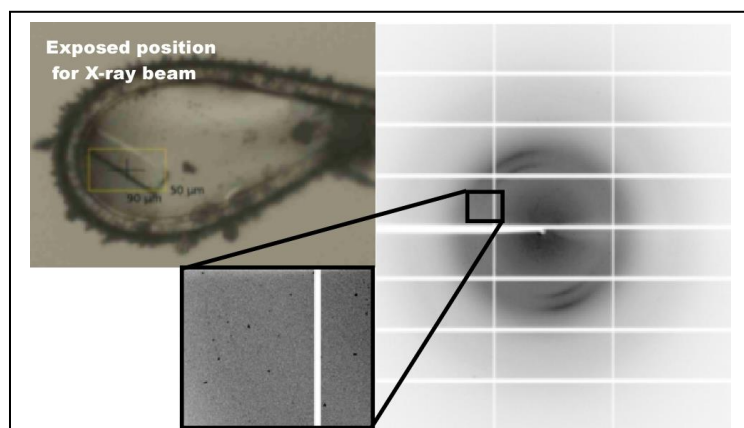


図10 ループにマウントされた、クライオ保護された糖転移酵素Aの結晶と、X線回折像。四角の枠を拡大して表示している。アイスリンクの外側 (およそ3 Å解像度に相当する位置) に回折点がみられる。



挿絵図 サラゴサ大学グレロ教授 (左端) のご家族と、ピラール広場にて。

表1 測定条件

Wavelength	1.0 Å
Beam Shape	80 μm x 50 μm rectangle
Distance	320.00 mm
$\Delta\varphi^\circ(\omega)$	0.50 deg
Exposure Time	0.498 sec.
Temperature	-173°C (100K)

統合したX線回折データを解析して、結晶構造を導き出した。そのさいの解析データを表に示す (表2)。この解析データからは、このX線解析データが2.9 オングストローム以下の分解能を持つことを示している。糖転移酵素Aの全体構造は、これまでに結晶構造解析がなされた糖転移酵素1 (Fritz et al.)、糖転移酵素2 (Fritz et al.)、糖転移酵素10 (Kubota et al.) と同じく、基質結合ドメインと酵素活性ドメインが、短いリンカーによって結合されたものであった。とても興味深いことに、これらのドメインは基質結合の表面と、酵素活性のある部分が近接しており、効率よく基質に糖を転移できる空間配置を示していた (図11)。糖転移酵素Aは他の糖転移酵素と異なり、左右対称の基質を認識することが分かっている (Lira-Navarrete et al.)。つまり、糖転移酵素1、2、10はいずれも左型の基質を認識するのに比べ、糖転移酵素Aは右型の基質を認識する。この基質対称性は生化学的には示されていたものの、その構造学的説明ができなかった。糖転移酵素Aの全体構造を、ほかの糖転移酵素と比べると、基質結合ドメインと酵素活性ドメインが左右対称にリンカーでつながっていた (図12)。ドメイン間の空間配置により、左右対称の基質をべつべつに認識していることが原子レベルで明らかにすることができた (非公表データ)。

表2 X線回折強度データの処理結果

Data set	DAP06-1
Space group	$P2_12_12_1$
$a$ (Å)	73.63
$b$ (Å)	128.85
$c$ (Å)	155.46
$\alpha=\beta=\gamma$ (°)	90.00
Resolution (Å)	77.73-2.79 (3.04-2.79)
Total reflections	250,220
Unique	71,059
Redundancy	3.52 (3.39)
$I/\sigma(I)$	5.04 (0.85)
Completeness (%)	0.999 (0.998)
$R_{\text{merge}}$	0.295 (1.603)



## 考察と議論

コペンハーゲン大学での留学中に、糖転移酵素Aの立体構造解析に成功した。分解能が2.9 Åと十分に高く、アミノ酸側鎖の原子の位置が、ほぼすべて正確における程度であった。結晶化中の糖転移酵素Aは、そのN末端側にあるループが切断を受けていた。そのため、結晶構造中には見ることができず、そのことを裏付けるように、タンパク質結晶そのもののクマジー染色とエドマン分解による解析では、ある一個所のアミノ酸の位置で切断されていることが確かめられている。

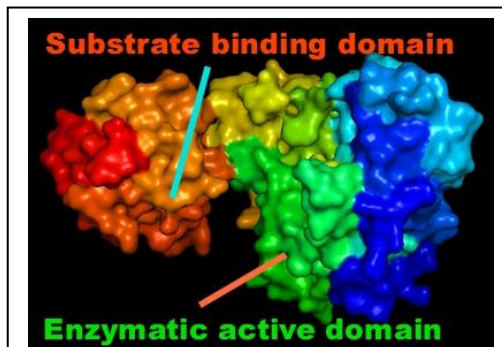


図11 糖転移酵素Aの構造の概観。基質結合ドメインと酵素活性ドメインが向かい合っていることがわかる。

今回の結晶解析は、ほ乳動物細胞を使ってタンパク質を産生させており、この方法は糖転移酵素群における初めての例である。これまでの解析の多くは酵母を使った発現系のため、十分な活性がえられているかどうか不確かなものも含まれているため、正確な構造を表現できているか議論があった。しかし、ほ乳動物細胞を使って産生した糖転移酵素は、その酵素活性が天然のものとはほとんど同程度であり、基質の特異性が確認されたものをもちている点が新しい。

糖転移酵素Aのみが左型（あらかじめガラクトサミンがN末側に付加されている）の基質を認識するのにたいし、構造が知られている他の糖転移酵素はすべて右型（ガラクトサミンがC末側に付加）の基質を認識していた。この基質特異性は生化学実験では知られていたものの、その認識の違いがいったいどのような構造の違いによるのか、全く分からなかった (Gerken et al., Reeves et al)。このたび、糖転移酵素Aと他の糖転移酵素の構造を比べると、はっきりとした違いを見て取ることができた。つまり、これらの糖転移酵素はいずれも、基質結合ドメインと酵素活性ドメインの2つの大きなドメインからなるが、これらのドメインの空間配置が酵素によって左右対称になっていたのである。このように、きわめて単純明快な方法で、各酵素は基質の特異性を生み出していることがうかがえる。

これらの糖転移酵素の活性が失われる遺伝的な疾患として、脂質代謝疾患、ミネラル代謝疾患が知られている。また、酵素の過剰な活性化により、代謝疾患および悪性腫瘍になることが分かっている。そのため、これらの糖転移酵素に特異的な阻害剤の開発がすすめられている (Song et al.)。当然今回の糖転移酵素の詳細な構造は、これら阻害剤の開発に有意義な情報を与えることができる。とくに基質と結合するドメインや、酵素活性を与えるドメインの構造は、それぞれの酵素に特徴的であり、特異的な阻害剤を考える上で必要不可欠な情報である。

酵素が基質を認識する仕組みを、原子レベルで完全に理解するには、基質と結合した状態で、酵素を結晶化しなければならない。ないしは、酵素だけの結晶に、比較的小さな基質を後から加えることで（結晶ソーキングと呼ばれる方法）、基質と結合した状態を出現させることができる。本解析でも、糖転移酵素Aの結晶に、活性化ガラクトサミンや、基質の糖ペプチドをソーキングした。しかしながら、結晶中での酵素の形が大きく変わってしまい、結晶が崩壊してしまったため、データをとるには至らなかった（サラゴサ大学グレロ教授との実験）。そのため、結晶ソーキング法ではなく、基質と酵素の共結晶を作る必要がある。糖転移酵素Aと基質（活性化ガラクトサミンおよび糖ペプチド）が共結晶化する条件を検討している。



本研究室では糖転移酵素Aの発見から、本酵素のさまざまな生産方法や解析方法を生み出してきた。酵素の活性を生化学的反応実験によるこれまでの膨大なデータと比べることで、精密に測ることができ、

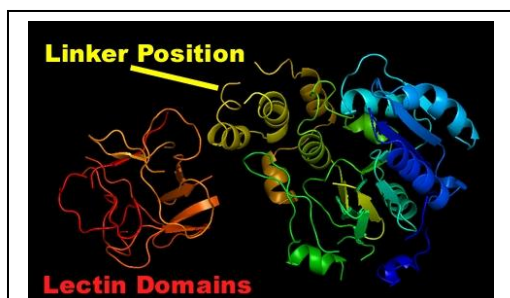


図12 糖転移酵素Aの構造のリボン表示。ドメイン間をつなぐリンカーを示す。基質ペプチド認識ドメイン内にある、レクチンドメインを赤色で示す。

また酵素の特異性も大規模質量分析計により精緻に比較することができた (Yang et al.)。そのため、もっとも天然に近い酵素を使って結晶構造解析を進めることができた。目的のタンパク質を結晶化するための研究を進める上で、必要不可欠な解析手法を用いることができたことが、本研究が成功したゆえんであろう。

#### 謝辞

本研究をおこなうにあたり、クラウセン教授とそのラボメンバーの方々に感謝いたします。および、アステラス病態代謝研究会に本留学の助成をいただきましたことに、この場をかりまして深く御礼申し上げます。

#### 引用文献

- Bennett, E. P., Hassan, H. & Clausen, H. (1996). *J Biol Chem* **271**, 17006-17012.
- Fritz, T. A., Hurley, J. H., Trinh, L. B., Shiloach, J. & Tabak, L. A. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15307-15312.
- Fritz, T. A., Raman, J. & Tabak, L. A. (2006). *J Biol Chem* **281**, 8613-8619.
- Gerken, T. A., Revoredo, L., Thome, J. J., Tabak, L. A., Vester-Christensen, M. B., Clausen, H., Gahlay, G. K., Jarvis, D. L., Johnson, R. W., Moniz, H. A. & Moremen, K. (2013). *J Biol Chem* **288**, 19900-19914.
- Kato, K., Jeanneau, C., Tarp, M. A., Benet-Pages, A., Lorenz-Depiereux, B., Bennett, E. P., Mandel, U., Strom, T. M. & Clausen, H. (2006). *J Biol Chem* **281**, 18370-18377.
- Kitada, S., Yamada, S., Kuma, A., Ouchi, S., Tasaki, T., Nabeshima, A., Noguchi, H., Wang, K. Y., Shimajiri, S., Nakano, R., Izumi, H., Kohno, K., Matsumoto, T. & Sasaguri, Y. (2013). *Br J Cancer* **109**, 472-481.
- Kubota, T., Shiba, T., Sugioka, S., Furukawa, S., Sawaki, H., Kato, R., Wakatsuki, S. & Narimatsu, H. (2006). *J Mol Biol* **359**, 708-727.
- Lira-Navarrete, E., de Las Rivas, M., Companon, I., Pallares, M. C., Kong, Y., Iglesias-Fernandez, J., Bernardes, G. J., Peregrina, J. M., Rovira, C., Bernado, P., Bruscolini, P., Clausen, H., Lostao, A., Corzana, F. & Hurtado-Guerrero, R. (2015). *Nat Commun* **6**, 6937.
- Lira-Navarrete, E., Iglesias-Fernandez, J., Zandberg, W. F., Companon, I., Kong, Y., Corzana, F., Pinto, B. M., Clausen, H., Peregrina, J. M., Vocado, D. J., Rovira, C. & Hurtado-Guerrero, R. (2014). *Angew Chem Int Ed Engl* **53**, 8206-8210.
- Lombard, V. (2014). *Nucleic Acid Res* **42**, 490-498.
- Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R. & Khorana, H. G. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13419-13424.
- Song, L., Bachert, C., Schjoldager, K. T., Clausen, H. & Linstedt, A. D. (2014). *J Biol Chem* **289**, 30556-30566.
- Tagliabracci, V. S., Engel, J. L., Wiley, S. E., Xiao, J., Gonzalez, D. J., Nidumanda Appaiah, H., Koller, A., Nizet, V., White, K. E. & Dixon, J. E. (2014). *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5520-5525.
- Topaz, O., Shurman, D. L., Bergman, R., Indelman, M., Ratajczak, P., Mizrachi, M., Khamaysi, Z., Behar, D., Petronius, D., Friedman, V., Zelikovic, I., Raimer, S., Metzker, A., Richard, G. & Sprecher, E. (2004). *Nat Genet* **36**, 579-581.
- Yang, Z., Wang, S., Halim, A., Schulz, M. A., Frodin, M., Rahman, S. H., Vester-Christensen, M. B., Behrens, C., Kristensen, C., Vakhrushev, S. Y., Bennett, E. P., Wandall, H. H. & Clausen, H. (2015). *Nat Biotechnol* **33**, 842-844.
- Yoshimura, Y., Nudelman, A. S., Levery, S. B., Wandall, H. H., Bennett, E. P., Hindsgaul, O., Clausen, H. & Nishimura, S. (2012). *Glycobiology* **22**, 429-438.
- Varki, A. (2010). *Essentials of Glycobiology* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ed. 2nd.